

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de odontología

**MASTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**



**TRABAJO FIN DE MASTER**

**Obtención de proteínas de membrana externa de  
bacterias periodontopatógenas y análisis de la  
respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis**

AUTOR

**Carmen María Solana Ferrer**

TUTOR

David Herrera González

Madrid, Septiembre 2018





## **ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO**

D./Dña. Carmen María Solana Ferrer con NIF 75483496A, estudiante de Máster en la Facultad de odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2017-2018, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado obtención de proteínas de membrana externa de bacterias periodontopatógenas y análisis de la respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son: David Herrera González

### **DECLARO QUE:**

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente. De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 27 de agosto de 2018

Fdo.:

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, flowing letters.

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.





## **MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

### **COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)**

**CENTRO:** Universidad complutense de Madrid

**ESTUDIANTE DE MÁSTER:** Ciencias odontológicas

**TUTOR/ES DEL TFM:** David Herrera González

**TÍTULO DEL TFM:** Obtención de proteínas de membrana externa de bacterias periodontopatógenas y análisis de la respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis

**FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA:** Septiembre/2017

**FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA** (en caso de producirse):

#### **1. Objeto**

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en ciencias odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

#### **2. Colaboración mutua**

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.



### **3. Normativa**

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

### **4. Obligaciones del estudiante de Máster**

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

### **5. Obligaciones del tutor/es del TFM**

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

### **6. Buenas prácticas**

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

### **7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos**

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del

tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

## **8. Confidencialidad**

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

## **9. Propiedad intelectual e industrial**

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

## **10. Periodo de Vigencia**

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:



- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre



su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 27 de agosto de 2018

<p>El estudiante de Máster</p>  <p>Fdo.:</p>	<p>El Tutor/es</p>  <p>Fdo.:</p>
--	--

**SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

### VISTO BUENO DEL TUTOR

MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

#### *El profesor / tutor*

Nombre y apellidos:	David Herrera González
---------------------	------------------------

#### *del alumno/a*

Nombre y apellidos	Carmen María Solana Ferrer
--------------------	----------------------------

#### *encuadrado en la línea de investigación*

Eficacia de los protocolos quirúrgicos y regenerativos en implantología
---

#### **DA EL VISTO BUENO**

para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Obtención de proteínas de membrana externa de bacterias periodontopatógenas y análisis de la respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid, a 27 de agosto de 2018.

Fdo: David Herrera González



## ÍNDICE

Resumen	2
1. Introducción	4
2. Objetivos	14
3. Material y métodos	16
3.1. Selección de pacientes	16
3.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	16
3.3. Extracción de Outer Membrane Proteins (OMPs) de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	17
3.4. Cuantificación de las muestras proteicas	18
3.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	19
3.6. Identificación de proteínas	19
3.7. Técnica de Western-blot	21
4. Resultados	24
5. Discusión	26
6. Conclusiones	32
7. Bibliografía	34
8. Anexos	44



## RESUMEN

**Introducción:** Las enfermedades periodontales son el resultado de la acumulación de microorganismos alrededor del diente y de la respuesta inmunitaria asociada. Las alteraciones provocadas por los mecanismos de defensa, en un intento de frenar el avance bacteriano, conducen a la pérdida de los tejidos de soporte. El cambio a una microbiota más patogénica, gram-negativa anaeróbica, dominada por microorganismos periodontopatógenos, puede marcar el inicio de la pérdida de inserción.

**Objetivo:** El propósito de este estudio ha sido comparar la respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis e individuos sanos frente a proteínas de membrana externa de las cepas *A. actinomycetemcomitans* DSMZ8324, *F. nucleatum* DSM20482, *P. gingivalis* ATCC33277 y *P. gingivalis* W83.

**Material y Métodos:** Los cultivos de células planctónicas se obtuvieron con una suspensión bacteriana de  $10^7$  unidades formadoras de colonia (UFC)/mL en medio *Brain Heart Infusion* (BHI) modificado tras 24 horas de incubación. Después se procedió a la extracción de las proteínas bacterianas y a su cuantificación por el método Bradford. Posteriormente, se obtuvo el perfil proteico mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y se identificaron por espectrometría de masas. La respuesta de anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes frente a las bacterias se estudió mediante la técnica de *Western-blot*.

**Resultados:** La mayoría de las proteínas identificadas han mostrado ser de membrana externa. El estudio de los sueros de los distintos individuos mostró una

respuesta variable de anticuerpos frente a las proteínas de las bacterias estudiadas, siendo de forma general mayor en los pacientes con periodontitis.

**Conclusiones:** La optimización de un protocolo de extracción para el enriquecimiento en proteínas bacterianas de membrana externa ha quedado evidenciado. La respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis e individuos sanos frente a proteínas de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis* ha sido variable y diferente entre los pacientes, no dependiendo siempre de la carga bacteriana que presenta el individuo.

## INTRODUCCIÓN

- **Las enfermedades periodontales**

Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por microorganismos que colonizan la cavidad oral y se adhieren a la superficie dentaria en el margen gingival y por debajo de él, organizándose en biopelículas (Mombelli *et al.* 1999). Dicha microbiota patógena produce cambios inflamatorios en las estructuras de soporte del diente, que incluyen el ligamento periodontal, el cemento, el hueso y la encía. Esta serie de alteraciones pueden dar como resultado la destrucción del tejido, generando un soporte reducido del diente, y en última instancia, la pérdida del elemento dentario (Lindhe *et al.* 1975).

Existe una relación directa entre la formación de la placa dental y el desarrollo de enfermedades periodontales (Loe *et al.* 1965), siendo la gingivitis el primer estadio de la patología, pudiendo derivar en periodontitis, con las distintas formas de presentación que posee. La gingivitis no afecta a la estructura de soporte dental y es reversible, lo que no ocurre en la periodontitis. No obstante, no todas las gingivitis evolucionan hasta convertirse en periodontitis, ya que la gingivitis es considerada una reacción inmunológica bien controlada, que puede no derivar en un estadio de afectación mayor. Sin embargo, ciertas personas con mayor susceptibilidad sufren finalmente periodontitis, la cual conlleva la pérdida del tejido óseo de soporte de los dientes, la destrucción del ligamento periodontal y la migración apical del epitelio de unión (Seymour *et al.* 1987).

Las enfermedades periodontales se clasificaron en 1999 (Armitage 1999) en: enfermedades gingivales, periodontitis crónica, periodontitis agresiva, periodontitis como manifestación de patología sistémica, enfermedad periodontal

necrotizante, abscesos del periodonto, periodontitis asociada con lesiones endodónticas y deformidades y condiciones de desarrollo o adquiridas.

Asimismo, pueden ser más ampliamente clasificadas por la extensión y gravedad de las mismas (Armitage 1999). Según la extensión de la enfermedad, se pueden clasificar en: localizada si afecta a menos del 30% de los sitios involucrados, o generalizada si afecta a más del 30%. O según la gravedad, en función de la cantidad de pérdida de inserción clínica (CAL) de la siguiente manera: leve = 1 o 2 mm CAL, moderada = 3 o 4 mm CAL, y severa =  $\geq 5$  mm CAL.

Recientemente, se ha introducido y publicado una nueva clasificación (Caton *et al.* 2018), en la cual las formas de periodontitis establecidas son: enfermedades periodontales necrosantes, periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas y periodontitis. Basándose, esta última, principalmente en el estadio de la enfermedad (según la severidad y complejidad del manejo), y el grado (definido por el ritmo de progresión y la respuesta anticipada al tratamiento).

En este trabajo, dado que el inicio del protocolo fue anterior al desarrollo de esta nueva clasificación, los pacientes se atuvieron a los parámetros descritos en la clasificación de 1999.

- **Microbiota oral**

El microbioma de la cavidad oral incluye más de 700 especies bacterianas, algunas de las cuales generan condiciones patológicas (Haffajee & Socransky 2006), y aunque se trata de un ambiente fundamentalmente aerobio, se encuentra mayoritariamente colonizado por bacterias anaerobias estrictas o facultativas.



Aunque normalmente dichas bacterias viven en un estado armónico con el huésped, se puede producir la interrupción del mutualismo existente, generarse un estado de disbiosis que contribuye a la aparición de enfermedad (Marsh 2017). Los factores del huésped que influyen en la composición, la actividad y la estabilidad bacteriana de la microbiota bucal son: temperatura, potencial redox del surco gingival, pH de la saliva, genética, salud y estilo de vida del huésped, receptores para la fijación de microorganismos, nutrientes, interacciones microbianas y defensas del huésped (Socransky & Haffajee 2005).

- **Microorganismos estudiados**

Entre los numerosos patógenos asociados a periodontitis, destaca el papel de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Es una especie bacteriana patógena gram-negativa que se localiza en la placa subgingival encontrándose asociada en gran medida con la patogénesis de la periodontitis. Es un bacilo, microaerófilo y capnófilo facultativo, que puede crecer de forma individual, formando parejas o grupos de colonias reducidos (Henderson *et al.* 2003). Es posible detectarlo en la cavidad oral de individuos periodontalmente sanos, aunque su importancia reside en la fuerte asociación que presenta con formas agresivas de periodontitis, principalmente aquellas que afectan a adultos jóvenes y adolescentes (Haubek *et al.* 2008, Henderson *et al.* 2010). Una particularidad del microorganismo es la capacidad que posee para causar enfermedad sin necesidad de asociarse a patógenos del complejo rojo

(Haffajee & Socransky, 1994). Asimismo, también se ha asociado con infecciones no orales como la endocarditis bacteriana (Van Winkelhoff *et al.* 1999).

Puede localizarse en la cavidad oral humana en diferentes hábitats, incluyendo: placa, tanto supragingival como subgingival, saliva, mucosa, encías, lengua y paladar duro (Asikainen *et al.* 1991). Se trata de una bacteria potencialmente patógena, la cual posee factores de virulencia que aumentan su supervivencia en la cavidad oral y le permiten evadir las estrategias de defensa del huésped. Presenta actividad leucotóxica, así como endotoxinas y exotoxinas, que pueden dañar directamente los tejidos del huésped. También tiene capacidad de unirse a las proteínas de la matriz extracelular (Mintz *et al.* 1999) y a células epiteliales (Meyer *et al.* 1994, Mintz *et al.* 1994). Otros factores son los relacionados con la secreción de bacteriocinas, la capacidad citotóxica y los factores inmunosupresores (Fives-Taylor *et al.* 1999).

#### *Fusobacterium nucleatum*

Juega también un papel relevante en el desarrollo de periodontitis. Es una bacteria anaerobia gram-negativa que puede aislarse tanto en localizaciones supra como subgingivales en el ámbito oral, siendo también una de las especies más comúnmente aisladas en infecciones extraorales presentando localizaciones tan diversas como hígado, cerebro, sangre y tracto genitourinario (Zilm *et al.* 2007, Chew *et al.* 2012), y con capacidad de producir enfermedades como artritis séptica y endocarditis (Yusuf *et al.* 2016). Existe también evidencia que sugiere que *F. nucleatum* se encuentra asociada con el incremento del riesgo de parto prematuro, así como con tumores intestinales (Chew *et al.* 2012).

Pertenece al llamado complejo naranja y se ha descrito como un organismo iniciador que promueve cambios en el surco gingival, permitiendo a los sucesores patógenos sensibles a los ácidos establecerse y proliferar (Marsh 1994). Por tanto, posee un papel fundamental en el desarrollo de la patología ya que actúa como puente entre colonizadores primarios y tardíos en el desarrollo de la biopelícula dental (Kolenbrander & London 1993). También se ha demostrado que sobrevive en condiciones de pH alcalino (Takahashi & Sato 2002) y que la formación de biopelículas formadas por dicha bacteria puede proporcionar protección a las células cuando se exponen a este tipo de entornos (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Es capaz de liberar elastasas, citoquinas y radicales de oxígeno de los leucocitos (Sheikhi *et al.* 2000), y puede provocar la muerte por apoptosis de células mono- y poli-morfonucleares (Jewett *et al.* 2000).

#### *Porphyromonas gingivalis*

Es una bacteria gram-negativa anaerobia fuertemente asociada a la patogénesis de la periodontitis, caracterizada por presentar una habilidad única para evadir la respuesta inmunológica (Tribble *et al.* 2013). Forma parte del “complejo rojo” de Socransky, y se le atribuye la capacidad de producir enfermedad debido a la presencia de una serie de factores de virulencia, como fimbrias, lipopolisacáridos, cisteínproteinasas y productos finales del metabolismo (Holt & Ebersole 2005). Asimismo, es capaz de desarrollar estrategias que le permiten manipular diversos mecanismos del sistema inmunológico innato, como el receptor *Toll-like* (TLR) y/o el sistema del complemento (Lambris *et al.* 2008, Flannagan *et al.* 2009). Esto le confiere capacidad para inhabilitar la respuesta general del huésped, ya que el complemento y los TLR desempeñan papeles

primordiales en el desarrollo de la respuesta del sistema inmunológico adaptativo (Hajishengallis *et al.* 2015, Medzhitov *et al.* 2007).

Además, los componentes de la superficie de *P. gingivalis* permiten a la bacteria interactuar con el medio externo y proliferar fácilmente, favoreciendo la ganancia de nutrientes, colonización y formación de una biopelícula que lo protege contra las defensas del huésped (Puig-Silla *et al.* 2009, Yoshimura *et al.* 2009).

Otro aspecto importante, es la expresión de moléculas de lipopolisacárido (LPS) que distorsionan la respuesta inmunitaria y actúan directamente sobre el sistema del complemento a través de sus gingipaínas específicas de arginina bloqueando la respuesta antimicrobiana (Calkins *et al.* 1998, Hajishengallis *et al.* 2007 y Palm *et al.* 2013).

La genotipificación de *P. gingivalis* revela que posee un alto grado de diversidad genética, lo cual explica el amplio rango de fenotipos distintos que es posible encontrar en relación con la virulencia de la bacteria (Igboin *et al.* 2009, Enersen *et al.* 2011). La cepa W83 fue aislada en la década de 1950 por Werner (Bonn, Alemania) a partir de una infección oral humana no documentada (Loss *et al.* 1993, Menard *et al.* 1995) y ha sido catalogada como una cepa virulenta. Presenta gran actividad glucolítica, pudiendo metabolizar numerosos azúcares, incluyendo almidón, melibiosa, galactosa y maltodextrina. Así mismo, en la capsula de *P. gingivalis* W83 pueden encontrarse azúcares como manosa, glucosa y ramnosa (Laine *et al.* 1998). Se ha sugerido que las cepas no virulentas de *P. gingivalis* poseen una capacidad limitada para la absorción y el metabolismo de los nutrientes orgánicos y que la utilización de glucosa y carbohidratos en general es muy pobre, no apoyando fácilmente el crecimiento (Shah *et al.* 1987). Por tanto, es

posible que esta diferencia en la capacidad metabólica sea uno de los puntos claves en la virulencia de la cepa W83.

- **Proteínas de membrana externa**

La membrana externa de las bacterias gram-negativas presenta una serie de características que la hacen única, ya que se encuentra compuesta por una capa interna que contiene fosfolípidos y una externa compuesta por LPS (Gan *et al.* 2008). Asimismo, también contienen proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*, OMPs), las cuales son proteínas de membrana integrales que cumplen una serie de funciones esenciales para la célula (Wimley 2003).

Cada OMP es sintetizada en el citoplasma celular, un lugar alejado del punto donde finalmente se insertarán, lo cual, obliga a sus precursores a ser transportados desde el punto de síntesis inicial hasta la membrana externa donde finalmente se encontrarán situadas. El transporte es de vital importancia, pues es necesario evitar la agregación de las mismas y conseguir mantenerlas en un estado competente para asegurar su funcionalidad final. El proceso reviste gran dificultad, debido a la necesidad de dichos precursores de atravesar la membrana interna hidrofóbica, así como el espacio acuoso periplásmico. Si el proceso es completado con éxito, las OMP finalmente se insertan en la membrana externa y se pliegan en su estado funcional (Weiner & Li 2008).

La descripción de la arquitectura de las OMP es en barril  $\beta$ , caracterizada por presentar bucles cortos en el lado periplásmico y bucles grandes y extendidos en el lado extracelular con un número par de hebras dispuestas en un patrón antiparalelo (Fairman *et al.* 2011). Esta disposición les permite resistir en el entorno en el que están presentes, ya que aporta gran estabilidad a la membrana,

característica de vital importancia debido a que se hayan expuestas en el exterior de la célula bacteriana y son la primera línea de contacto entre la bacteria y el medio. Así mismo, debido a dicha ubicación clave, las OMPs presentan diferentes funciones, actuando como receptores de fagocitos, poros de difusión, proteasas o factores mitógenos (Bolstad *et al.* 1990).

En cuanto a las cepas patógenas, una gran cantidad de estas OMPs también sirven como factores de virulencia, que actúan eliminando nutrientes y permitiendo la evasión de los mecanismos de defensa del huésped (Rollauer *et al.* 2015). Una característica de especial relevancia que poseen algunas OMPs es su capacidad inmunogénica o capacidad de provocar respuesta inmunológica (Bolstad *et al.* 1990).

- **Respuesta inmunológica en enfermedades periodontales**

Las enfermedades periodontales, en todas sus presentaciones clínicas, son el resultado de la acumulación de microorganismos alrededor del diente con la estimulación del sistema inmunitario asociada. La placa bacteriana es el agente etiológico más importante de las enfermedades periodontales, sin embargo, la pérdida de soporte se produce debido a las alteraciones provocadas por los mecanismos de defensa, en un intento de frenar el avance bacteriano, siendo las bacterias, únicamente el estímulo para el sistema inmunitario. Por tanto, el cambio a una microbiota más patogénica, esto es, gram-negativa anaeróbica y dominada por microorganismos como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum*, entre otras, puede marcar el inicio de la pérdida de inserción.

Uno de los principales mecanismos de protección que ayudan a mantener la salud de los tejidos periodontales es el fluido gingival crevicular, el cual permite la

remoción mecánica de las bacterias y otros componentes. Además, contiene lisozimas, inmunoglobulinas (IgA, IgG) que ayudan a frenar la inflamación (Delima & Van Dyke 2003, Goodson 2003).

En el fondo del surco, sellado por las células del epitelio de unión se observa gran actividad biológica, ya que estas células tienen alta capacidad mitótica y renuevan el epitelio de unión constantemente y también, son capaces de producir péptidos antimicrobianos (por ejemplo, defensinas) y citoquinas como las interleucinas (IL-1 e IL-8) y el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) (Shimono *et al.* 2003, Pöllänen *et al.* 2003). De esta manera, aunque existan bacterias, hay balance entre éstas y la respuesta del huésped.

El sistema inmunitario se activa cuando las bacterias producen factores de virulencia y éstos entran en contacto con las células del epitelio del surco, siendo entonces cuando se desencadena la respuesta inmunológica innata, seguida de la respuesta inmunológica adaptativa con la aparición de linfocitos T CD4 y linfocitos B (Kornman *et al.* 1997). Dichos linfocitos T CD4 estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos, que pueden ser de distintos tipos. Dentro de la cavidad oral los más importantes son las IgA e IgG. Así mismo, también producen citoquinas, (interferón (IFN $\gamma$ ), IL-2, etc.) que promueven la actividad de los macrófagos (Abbas *et al.* 2007).

Cuando la lesión periodontal es inicial, la respuesta inmunológica es principalmente del tipo innato, aunque posteriormente se podría complementar con una respuesta de tipo adaptativo en caso de que la infección continúe progresando.

A medida que se vuelve más compleja la microbiota, la acumulación de células inflamatorias, citoquinas y metaloproteinasas se distribuyen cada vez más en sentido apical dentro del tejido conectivo, desarrollándose una lesión progresiva, ésto es, aquella que muestra pérdida de inserción ( $> 3$  mm) y la formación de la bolsa periodontal. Esta lesión presenta como características inmunológicas una respuesta inmunitaria innata poco eficiente, abundantes células plasmáticas (50%) y linfocitos T CD4 del perfil Th1 (linfocito T helper 1) y Th2 (linfocito T helper 2). El perfil de linfocitos Th1 produce IFN $\gamma$  e IL-2, y esto favorece una fuerte respuesta de los macrófagos y neutrófilos, y la producción de anticuerpos tipo IgG; mientras que los linfocitos del perfil Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favoreciendo la producción de la mayoría de los distintos tipos de anticuerpos (entre ellos IgA) y la supresión de los macrófagos (Gemmell & Seymour 1998, Nakajima *et al.* 2005, Takeichi *et al.* 2000, Berglundh *et al.* 2002).

Una vez que, tanto los linfocitos T como linfocitos B se encuentran activados, y reconocen epítomos diferentes del mismo antígeno (proteína), se produce la interacción entre ambos. El linfocito B presenta al linfocito T helper al antígeno, el cual será reconocido a través de su receptor (TCR, receptor de linfocitos T), generándose señales, tanto por sustancias solubles como por la interacción de sus receptores, que provocarán que el linfocito B secrete un tipo u otro de anticuerpos, pero siempre específicos de dicho antígeno. Es por tanto interesante en este sentido estudiar la respuesta de los anticuerpos de los pacientes con periodontitis y pacientes sanos con presencia de bacterias periodontopatógenas frente a distintos tipos de microorganismos.



## OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron:

- Validar un método de obtención de proteínas de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*.
- Comparar la respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis e individuos sanos frente proteínas de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*



## MATERIAL Y MÉTODOS

- **Selección de pacientes**

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron reclutados dentro del proyecto de investigación “Detección y cuantificación de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en bacteriemias secundarias a periodontitis y asociación con enfermedades cardiovasculares” (Ministerio de Ciencia e Innovación PI11/00542). Dicho proyecto cuenta con la correspondiente aprobación del Comité de Ética, y de todos los pacientes se obtuvo el consentimiento informado.

El criterio de selección de los sueros, en el caso de *A. actinomycetemcomitans*, fue la utilización de todos aquellos en lo que se aislara la especie bacteriana. Para *F. nucleatum* y *P. gingivalis* la selección de los sueros se basó, en primer lugar, en la presencia de dichas especies bacterianas, sin encontrarse de forma simultánea o con una mínima carga bacteriana de la no estudiada en cada caso. Sí se admitieron aquellos sueros en los cuales la carga bacteriana contuviera otras especies no incluidas en el estudio. Así mismo, se tuvo en cuenta la carga bacteriana, seleccionando aquellos que más cantidad presentaran.

Se realizó el mismo protocolo para las tres especies bacterianas estudiadas: *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*.

- **Cepas bacterianas y condiciones de cultivo**

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSMZ8324, *Fusobacterium nucleatum* DSM20482, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 y *Porphyromonas gingivalis* W83. Cada una de ellas por separado, fueron cultivadas en placas de agar sangre (Blood Agar

Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado con 5% (v/v) de sangre de caballo estéril (Oxoid); 5.0 mg/L de hemina (Sigma, St. Louis, MO) y 1.0 mg/L de menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones anaeróbicas (10% de H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y equilibrio de N<sub>2</sub>) a 37°C durante 24-72 h.

Posteriormente fueron transferidas a un medio rico en proteínas, BHI modificado, el cual estaba compuesto por BHI (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) suplementado con 2.5 g/L de mucina (Oxoid), 1.0 g/L de extracto de levadura (Oxoid), 0.1 g/L de cisteína (Sigma), 2.0 g/L de bicarbonato sódico (Merck), 5.0 mg/L de hemina (Sigma), 1.0 mg/L de menadiona (Merck) y 0.25% (v/v) de ácido glutámico (Sigma) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, en condiciones de anaerobiosis, a 37°C.

A continuación, los cultivos de células planctónicas se obtuvieron inoculando 30 mL del medio BHI modificado con suspensión de bacteria a la concentración de 10<sup>7</sup> UFC (unidad formadora de colonias)/mL en un tubo de plástico estéril de 50 mL, incubándose a 37°C durante 24 h en condiciones de anaerobiosis. Las células provenientes del cultivo, fueron centrifugadas para eliminar el sobrenadante y resuspendidas en un tampón adecuado para poder sonicar.

- **Extracción de *Outer Membrane Proteins* (OMPs) de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis***

El siguiente paso fue la extracción de las proteínas bacterianas, para lo cual se procedió a la ruptura de la célula en un tampón adecuado para evitar la lisis de las proteínas, la agregación proteica y favorecer la resuspensión de éstas.

Las células de ambas cepas bacterianas se resuspendieron en 3.5 mL de HEPES 10mM (pH 7.4) conteniendo 17.5 µL de fluoruro de metil fenil sulfonato

(PMSF, inhibidor de proteasas) (0.5 mM) + 350  $\mu$ L cocktail inhibidor de proteasas (10x).

Posteriormente la suspensión fue sonicada, dicho método consigue la ruptura de las membranas bacterianas utilizando ondas de ultrasonido mediante un sonicador ultrasónico de punta Branson (10 pulsos discontinuos de 20 milisegundos durante 3 segundos). Posteriormente, se centrifugó para descartar el “debris” celular durante 10 min a 2000g a 4°C.

El sobrenadante se ultracentrifugó a 105000g a 4°C durante 1 h y el pellet que se obtuvo, correspondió a la fracción de membrana total. Este pellet fue resuspendido en 1% de lauroylsarcosina sódica (Sarkosyl) en 10 mM HEPES (pH 7.4) (100  $\mu$ L) y fue agitado suavemente (en vortex) durante 1h a temperatura ambiente, para conseguir la separación de ambas membranas.

A continuación, la suspensión fue ultracentrifugada a 105000g durante 1 h a 4°C y se obtuvo, por un lado la fracción enriquecida en membrana interna (Sarkosyl-soluble) que es el sobrenadante y la fracción enriquecida en membrana externa (Sarkosyl-insoluble) que es el pellet.

- **Cuantificación de las muestras proteicas**

El pellet correspondiente a la fracción enriquecida en membrana externa se resuspendió en agua milliQ. Tras lo cual, se realizó la cuantificación de la cantidad de proteína mediante el ensayo de proteína Bradford. Este método consiste en añadir el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) a las muestras, incubar y medir la absorbancia a 595 nm empleando una curva patrón con albúmina de suero bovina (BSA) de concentración conocida.

- **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Tras cuantificar las muestras, se procedió a la obtención del perfil proteico en un gel SDS-PAGE (Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico) (condiciones desnaturalizantes). Para ello se tomaron 20 µg de cada una de las muestras y se les añadió un volumen igual de tampón de carga (2x), que contenía 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, SDS (Dodecil Sulfato Sódico) al 5% (p/v), glicerol al 25% (v/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v) y DTT (ditiotreitól) al 20% (p/v). Las muestras se desnaturalizaron (incubando 5 min a 95°C y 2 min en hielo) previa a su separación mediante electroforesis.

Para la electroforesis SDS-PAGE, se utilizó el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell electrophoresis (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida se hicieron al 10% y el patrón de pesos moleculares que se empleó fue Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad). El tampón de electroforesis que se utilizó contenía Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0.1% (p/v). El gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 (0.25% azul de Coomassie R-250, 50% metanol, 9% ácido acético, 41% agua MilliQ (agua de máxima pureza)) durante al menos 2 horas y se destiñó con la solución de desteñido (40% metanol, 7% ácido acético, 53% agua MilliQ) hasta que se observaron las bandas proteicas correspondientes a las OMPs de las diferentes bacterias en estudio.

- **Identificación de proteínas**

Las proteínas visualizadas en los geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie fueron recortadas de la acrilamida, digeridas con tripsina y los péptidos resultantes de la digestión fueron separados e identificados por espectrometría de masas. Todo este proceso se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica de la UCM.

### Identificación por huella peptídica

La identificación de las proteínas por huella peptídica se realizó con el motor de búsqueda MASCOT v2.3 a través del software Global Protein Server (GPS) v3.6 (ABSCIEX), en la base de datos con los siguientes parámetros de búsqueda: carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, tolerancia de error de masa para los péptidos 50 ppm y un punto de corte perdido para la tripsina.

Las proteínas identificadas superaban la puntuación estimada en cada caso por MASCOT con un valor significativo de  $p < 0.05$ .

Como resultado de este primer análisis de masas se obtuvo un espectro MS, y esta huella peptídica de la proteína se utilizó para su identificación en la base de datos. Las proteínas que no se identificaron de forma concluyente por huella peptídica fueron susceptibles de análisis MS/MS o fragmentación de péptidos. Así, en el espectro MS se seleccionaron de 1 a 4 péptidos precursores con buena intensidad y separados de otros péptidos como mínimo en  $\pm 4$  Da (ventana de Masa) para ser aislados, cada uno de ellos en un análisis independiente, en una cámara y fragmentados por colisión con gas atmosférico (Collision Induced Dissociation, CID) con el método de operación de 1Kv ion reflector en modo positivo. Con los espectros MS/MS obtenidos de cada uno de los precursores fragmentados se realizó la búsqueda de la proteína en las bases de datos.

### Identificación por huella peptídica combinada con MS/MS

Los parámetros de búsqueda fueron los mismos utilizados en la identificación por huella peptídica a excepción de la tolerancia del error para la

masa del precursor que en este caso fue de 80 ppm, y la tolerancia en las masas de los fragmentos (MS/MS) de 0.3 Da.

El péptido identificado superaba la puntuación individual del ion que determina MASCOT como un valor significativo de  $p$ -value <0.05.

- **Técnica de Western-blot**

Para el análisis de inmunotransferencia, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m (Amersham Protran; GE Healthcare, Uppsala, Suecia) a 100 V durante 1 h con un tampón de transferencia 1x (glicina 38.6 mM, Tris 41.3 mM, 0.04% de SDS, 20% de metanol) y se empleó el sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Se comprobó la eficacia de la transferencia usando los marcadores ECL DualVue Western-Blot (GE Healthcare). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con un agente bloqueante (GE Healthcare) al 5% (p/v) en TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.03% (v/v)) (AppliChem Panreac, Darmstadt, Alemania).

Las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los diferentes sueros [dilución final 1:400 en TTBS con agente bloqueante al 1% (p/v) para las OMPs de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*; dilución final 1:250 en TTBS con agente bloqueante al 1% (p/v) para las OMPs de *F. nucleatum*] extraídos de pacientes con periodontitis (positivos para cada una de las tres bacterias en el fluido gingival crevicular) e individuos sanos con los datos clínicos y microbiológicos mostrados en las Tablas 1 y 2. Se ha de indicar que algunos de los pacientes presentan solamente una de las bacterias de estudio, mientras que otros presentan dos de las mismas.



Como control se utilizó un suero (dilución 1:400 o dilución 1:250) recogido de un paciente periodontalmente sano, con ausencia de patógenos periodontales. También se utilizaron sueros de individuos sanos pero con presencia de bacterias periodontales en estudio.

Después del lavado con TTBS, como anticuerpo secundario, se emplearon anticuerpos policlonales IgGs anti-humano conjugado con peroxidasa (Fc-específico) (Sigma) (dilución final 1:2000 en TTBS con agente bloqueante al 1% (p/v)) durante 2 h a temperatura ambiente. Se procedió al lavado de las membranas con TTBS. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare) y films Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) (película de rayos X).



## RESULTADOS

En el presente estudio se ha puesto a punto un protocolo de extracción para el enriquecimiento en proteínas de membrana externa (OMPs) de los siguientes microorganismos periodontopatógenos: *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*. La optimización de este protocolo queda reflejada en tanto en cuanto la mayoría de las proteínas identificadas son proteínas de membrana externa o proteínas de membrana como aparece indicado en las Tablas 3-6. Tras la extracción de estas proteínas, se procedió a su separación mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y posterior visualización tiñendo los geles con azul de Coomassie. Los perfiles proteicos que se obtuvieron aparecen reflejados en la Figura 1.

La inmunogenicidad de las proteínas extraídas fue detectada utilizando la técnica de western-blot. Como se ha indicado anteriormente, las proteínas (20 µg por muestra) se separaron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para incubarse con los sueros de los distintos individuos. Se analizaron las diferentes respuestas inmunitarias de los anticuerpos frente a las proteínas de membrana externa extraídas de las bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis* (las cepas ATCC33277 y W83) como se muestra en las Figuras 2-7.

En las Figuras 2 y 3 se muestran los western-blot con sueros de pacientes sanos y enfermos frente a OMPs de *A. actinomycetemcomitans*.

De manera general, se observa una fuerte respuesta inmunitaria de los sueros de pacientes enfermos (Figura 3), a diferencia de la observada con el suero

control (paciente con ausencia de bacteria) (C2) (Figura 2). En el caso de este suero concretamente, se puede observar que hay una respuesta muy leve frente a las diferentes OMPs. En el suero C12 existe una respuesta moderada frente a las distintas proteínas, mientras que en el suero C26 la respuesta fue menor. Cuando se pusieron en contacto las OMPs con los sueros de los pacientes enfermos, se observó respuesta en todos los casos, aunque con distinto grado, siendo mayor en los sueros S3, S11 y S30, cuyas bandas se observan con mayor intensidad.

En las Figuras 4 y 5 se muestran los western-blot con sueros de pacientes sanos y enfermos frente a OMPs de *F. nucleatum*.

Se observa respuesta inmunitaria con todos los sueros. Tanto el suero control (C2), como el suero C28 muestran una considerable respuesta inmunológica. Así mismo, entre los sueros de pacientes enfermos la mayor respuesta se observa en el suero S3.

Las Figuras 6 y 7 muestran los western-blot de con sueros de pacientes sanos y enfermos frente a OMPs de dos cepas de *P. gingivalis*, *P. gingivalis* ATCC33277 (segundo carril en cada western) y *P. gingivalis* W83 (primer carril en cada western).

La respuesta inmunológica observable en el control (C2) (Figura 6) es casi inapreciable, a diferencia de la obtenida en el control C3, el cual muestra respuesta para ambas cepas siendo considerablemente mayor para la cepa más virulenta (W83). Se observó respuesta de los sueros de pacientes enfermos en todos los casos, variando desde una respuesta muy leve en el caso del suero S10 a una respuesta notablemente mayor en el suero S18. La respuesta en todos los casos fue mayor en el caso de la cepa virulenta W83.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha puesto a punto un protocolo de extracción de proteínas de membrana externa en *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, tanto la cepa ATCC33277 como la W83. Este protocolo es adecuado puesto que, por espectrometría de masas, se han identificado proteínas de membrana externa de las especies bacterianas de estudio. Asimismo, mediante la técnica de western-blot, se ha determinado que la repuesta inmunitaria de diversos sueros de individuos con periodontitis e individuos sanos es variable y no depende siempre de la carga bacteriana que presenta el individuo.

La técnica de western-blot es una de las técnicas de referencia utilizada para la detección de anticuerpos presentes en suero de pacientes contra proteínas de microorganismos de interés (Haase *et al.* 1999). Watanabe *et al.* (1989), usando la técnica de western-blot, identificaron 13 antígenos de *A. actinomycetemcomitans* que reaccionaban con anticuerpos del suero de pacientes con periodontitis crónica generaliza, periodontitis juvenil y pacientes sanos. Nueve de ellos fueron identificados como OMPs, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio, puesto que las proteínas obtenidas con nuestro protocolo de extracción, dan una reacción antígeno-anticuerpo con los sueros de los pacientes.

En el caso de *A. Actinomycetemcomitans*, la respuesta inmunitaria en individuos enfermos fue de manera general mayor que en individuos sanos, aunque estos últimos también presentaron cierto grado de respuesta. Sin embargo, en los sueros C.26 y S.11, la respuesta no corresponde a la cantidad de bacteria existente, siendo similar en ambos y dando como resultado respuestas diferentes. Estos resultados pueden ser atribuidos a la presencia en el caso del suero S.11 de

una mayor carga bacteriana de *P. Gingivalis*, *Prevotella Intermedia* y *Parvimonas micra* pudiendo producirse una respuesta inmunológica inespecífica que amplifica la señal observada en el caso de este suero.

No obstante, dichos resultados también pueden ser coherentes, sin tener en cuenta la respuesta inespecífica, ya que la respuesta de anticuerpos frente al patógeno es dependiente de la posibilidad de que el paciente haya podido tener infecciones latentes anteriormente, o del hecho de haber tenido una infección previa por dicho microorganismo en otra localización corporal. Se sabe que *A. actinomycetemcomitans* puede encontrarse en localizaciones diversas como pulmón o mediastino (Morris & Sewell 1994, Zijlstra *et al.* 1992, Razafimanjato *et al.* 2016) y ser causante de infecciones no orales, como la endocarditis bacteriana, siendo por tanto posible que la infección en alguno de los casos estuviese causada por dicho patógeno, generándose por tanto la reacción inmunológica específica frente al mismo, pero proviniendo de una localización extraoral.

Los sueros S.4 y S.21 presentan gran cantidad de carga bacteriana, sin embargo, la respuesta en ellos fue menor en comparación con el resto de sueros de pacientes enfermos. Este hecho podría atribuirse a que dichos pacientes podrían encontrarse inmunizados únicamente frente a algunas proteínas y no frente a la gran mayoría, observándose por tanto una serie de bandas más nítidas en el primer caso y una respuesta más generalizada en el segundo. Estos resultados muestran que la respuesta de los pacientes es muy diversa.

Komatsuzawa *et al.* (2002) identificaron seis OMPs principales de *A. actinomycetemcomitans* usando PCR e inmunotransferencia. Demostraron que OMP39 mostró similitud con las porinas de algunas bacterias Gram-negativas. Sin

embargo, en dicho estudio, el suero sensibilizado con *A. actinomycetemcomitans* no reaccionó fuertemente con OMP39, por lo que hipotetizaron que la región que expone la superficie celular en OMP39 puede ser menos inmunogénica en comparación con otras OMPs. Sin embargo, en nuestro estudio OMP39 resultó ser fuertemente inmunogénica como muestra la respuesta de los sueros.

La respuesta observada para *P. gingivalis* en enfermos fue generalmente mayor que en individuos sanos, exceptuando el suero S.10, el cual del mismo modo que se describió para *A. actinomycetemcomitans*, presenta gran carga bacteriana y muy leve respuesta inmunitaria. Es, por tanto, asumible que la respuesta de anticuerpos sea igualmente dependiente de la posibilidad de que el paciente haya podido tener infecciones latentes o del hecho de haber tenido infección previa por dicho microorganismo en otra localización corporal. En todos los casos la respuesta inmunológica observable en W83 fue mayor que en *P. gingivalis* ATCC33277. Por tanto, para *P. gingivalis* se observa también una respuesta variable en los sueros con predominio en la intensidad de respuesta de la cepa virulenta (W83).

Curtis *et al.* (1991) observaron una mayor respuesta inmunológica de proteínas con pesos entre 30 y 45 kDa, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que entre dichas bandas se encuentra la mayor intensidad de reacción (Figuras 6 y 7). En su trabajo los autores concluyeron que las proteínas de peso molecular 55, 47 y 40 kDa son importantes antígenos de superficie de *P. gingivalis* W83, lo cual concuerda también con los resultados obtenidos en el presente estudio, pues en todos los casos se observa reacción en dichas localizaciones. Del mismo modo establecieron que las proteínas de peso

molecular 40, 55 y 115 kDa eran las más importantes en el caso de *P. gingivalis* W83. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, pues dichas proteínas producen reacción inmunológica en la mayoría de los sueros.

En el caso de *F. nucleatum* se observa respuesta inmunitaria de todos los sueros, destacando la reacción del suero S.28, cuyo paciente presenta menor cantidad de bacteria que el S.1 y mayor respuesta. Estos resultados son atribuibles, al igual que en *A. actinomycetemcomitans* a que la respuesta de anticuerpos frente al patógeno es dependiente de la posibilidad de que el paciente haya podido tener infecciones latentes por el mismo microorganismo anteriormente o al hecho de haber tenido una infección previa pero en otra localización corporal.

Kaur *et al.* (1992) mostraron reacciones antigénicas en proteínas de peso molecular 53 kDa y 30 kDa, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio, pues dichas bandas mostraron reacción en la mayoría de los sueros.

*F. nucleatum* no ha sido tan ampliamente estudiado como las otras dos cepas en referencia a sus OMPs, siendo por tanto difícil la comparación con el presente estudio. Mayor número de investigaciones serán requeridas para contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Como continuación del trabajo sería interesante la detección de la respuesta inmunitaria de forma local para poder excluir la causada por las bacterias en otras zonas. Se podrían analizar los anticuerpos obtenidos del fluido gingival crevicular, de forma similar a como se hace con otras localizaciones (Choonharuangdej *et al.* 2011; Guentsch *et al.* 2011; Khurshid *et al.* 2017). Así mismo, se hace necesario conocer si el individuo ha tenido una infección latente de los microorganismos estudiados, lo cual puede generar la respuesta de anticuerpos durante largo



tiempo. Por tanto, la detección en suero del tipo de anticuerpo (IgG o IgM) encontrado en cada respuesta es fundamental para estimar la presencia de inflamación aguda o crónica, así como la evolución de la enfermedad. Dicho proceso de determinación está estandarizado en otras infecciones, como por ejemplo, hepatitis, toxoplasmosis, etc. (Díaz-Suárez *et al.* 2003), en las cuales los niveles altos de IgG (que se elevan más tardíamente) indican infección crónica o que ha habido contacto entre la bacteria y el paciente en algún momento de la vida y los niveles altos de IgM son considerados un marcador de fase aguda de la enfermedad, permitiendo concretar en mayor medida la respuesta inmunológica observada.



## CONCLUSIONES

1. El método propuesto ha sido validado y ha permitido la obtención e identificación de proteínas de membrana externa en *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*.
2. El análisis de la respuesta inmunitaria de pacientes con periodontitis e individuos sanos frente a proteínas de membrana externa de *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis* ha sido variable y diferente entre los pacientes, no dependiendo siempre de la carga bacteriana que presenta el individuo. De manera general, ha sido diferente en pacientes con periodontitis frente a pacientes periodontalmente sanos.



## BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Effector mechanisms of cell mediated immunity. En: Cellular and molecular immunology. Saunders Elsevier 6.<sup>a</sup> ed. Philadelphia: PA; 2007; p. 303-320.

Ali Mohammed MM, Nerland AH, Al-Haroni M, Bakken V. Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. J Oral Microbiol. 2013;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20015.

Arndt Guentsch, DMD, Martin Kramesberger, DMD, Aneta Sroka, MSc, Wolfgang Pfister, Professor, Jan Potempa, & Sigrun Eick, DMD J. Comparison of Gingival Crevicular Fluid Sampling Methods in Patients with Severe Chronic Periodontitis. J Periodontol. 2011; 82(7): 1051–1060.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4:1-6.

Asikainen S, Alaluusua S, Saxén L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. J Periodontol. 1991;62:203-6.

Bolstad AI, Kristoffersen T, Olsen I, Preus HR, Jesen HB, Vasstrand EN, Bakken V. Outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* studied by SDS-PAGE and immunoblotting. Oral Microbiol Immunol. 1990;5:155-61.

Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J. Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. J Biol Chem. 1998 20;273:6611-4.

Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman K, Mealey B, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti M. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018; 89 Suppl 1:S1-S8.

Chew J, Zilm PS, Fuss JM, Gully NJ. A proteomic investigation of *Fusobacterium nucleatum* alkaline-induced biofilms. *BMC Microbiol*. 2012;12:189.

Curtis MA, Slaney JM, Carman RJ, Johnson NW. Identification of the major surface protein antigens of *Porphyromonas gingivalis* using IgG antibody reactivity of periodontal case-control serum. *Oral Microbiol Immunol*. 1991;6:321-6.

Enersen M. *Porphyromonas gingivalis*: a clonal pathogen?: Diversities in housekeeping genes and the major fimbriae gene. *J Oral Microbiol*. 2011;3. doi: 10.3402/jom.v3i0.8487.

Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003;31: 55-76.

Díaz-Suárez O. Serologic diagnostic of *Toxoplasma gondii* infections. *Invest Clin*. 2003;44:85-7.

Fairman JW, Noinaj N, Buchanan SK. The structural biology of  $\beta$ -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol*. 2011;21:523-31.

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000*. 1999;20:136-67.

Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:355-66.

Gan L, Chen S, Jensen GJ. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:18953-7.

Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. J Dent Res. 1998;77:16-26. Seymour GJ.

Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. Periodontol 2000. 2003;31:43-54.

Haase EM, Zmuda JL, Scannapieco FA. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 1999;67:2901-8.

Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. Periodontol 2000. 2006;42:7-12.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994;5:78-111.

Hajishengallis G, Shakhatreh MA, Wang M, Liang S. Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. J Immunol. 2007;179:2359-67.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol. 2015;15:30-44.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol. 2004;2:95-108.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. Lancet. 2008 19;371:237-42.

Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Annu Rev Microbiol. 2003;57:29-55.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000. 2005;38:72-122.

Igboin CO, Griffen AL, Leys EJ. *Porphyromonas gingivalis* strain diversity. J Clin Microbiol. 2009;47(10):3073-81.

Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. Infect Immun. 2000;68:1893-8.

Kaur M, Falkler WA Jr. Characterization of shared antigens of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum*. Oral Microbiol Immunol. 1992;291-8.

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol. 1993;175:3247-52.

Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, Ohara M, Kurihara H, Sugai M. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Gene. 2002 17;288:195-201.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontol 2000. 1997;14:33-53.

Laine ML, van Winkelhoff AJ. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. Oral Microbiol Immunol. 1998;13(5):322-5.



Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol. 2008;6:132-42.

Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. J Periodontal Res. 1975;10:243-55.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 1965;36:177-87.

Loos BG, Dyer DW, Whittam TS, Selander RK. Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. Infect Immun. 1993;61(1):204-12.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res. 1994;8:263-71.

Marsh PD. Biopelículas dentales. En: Lang NP y Lindhe J. Periodoncia clínica e implantología odontológica. Vol 1. 6ed. España Panamericana; 2017. p.169-182.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007 18;449(7164):819-26.

Ménard C, Mouton C. Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Infect Immun. 1995;63(7):2522-31.

Mohammed MMA, Pettersen VK, Nerland AH, Wiker HG, Bakken V. Quantitative proteomic analysis of extracellular matrix extracted from mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. Anaerobe. 2017;44:133-142.

- Mombelli A, Gmür R, Lang NP, Corbert E, Frey J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. J Clin Periodontol. 1999;26:505-10.
- Morris JF, Sewell DL. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. Clin Infect Dis. 1994;18:450-2.
- Nakajima T, Ueki-Maruyama K, Oda T, Ohsawa Y, Ito H, Seymour GJ, Yamazaki K. Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. J Dent Res. 2005;84:639-43.
- Palm E, Khalaf H, Bengtsson T. *Porphyromonas gingivalis* downregulates the immune response of fibroblasts. BMC Microbiol. 2013;13:155.
- Paul-Satyaseela M, Karched M, Bian Z, Ihalin R, Borén T, Arnqvist A, Chen C, Asikainen S. Immunoproteomics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer-membrane proteins reveal a highly immunoreactive peptidoglycan-associated lipoprotein. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 7):931-42.
- Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. Periodontol 2000. 2003;31:12-31.
- Puig-Silla M, Dasí-Fernández F, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012;17:e1047-53.

Razafimanjato NN, Portela AM, Radu DM, Guiraudet P, Destable MD, Seguin A, Martinod E. A case of mediastinum actinomycosis by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Rev Pneumol Clin. 2016;72:363-366.

Seymour GJ. Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. J Dent Res. 1987;66:2-9.

Shah HN, Williams RAD. Utilization of glucose and amino acids by *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides gingivalis*. Current Microbiol. 1987;15:241-246.

Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. J Clin Periodontol. 2000;27:758-62.

Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka K, Inoue T et al. Biological characteristics of the junctional epithelium. J Electron Microsc 2003; 52: 627-639.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135-87.

Suwan Choonharuangdej<sup>1</sup>, Aurasri Chutinet<sup>2</sup> & Yosvimol Kuphasuk<sup>3</sup>. Crevicular *Porphyromonas gingivalis*-specific immunoglobulin A levels in healthy and periodontitis-affected Thai cohorts. Journal of Investigative and Clinical Dentistry. 2011;43-50.

Takahashi N, Sato T: Dipeptide utilization by the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. Oral Microbiol Immunol. 2002; 7:50-54.

Tribble GD, Kerr JE, Wang BY. Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. *Future Microbiol.* 2013;8:607-20.

Van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000. 1999;20:122-35.

Watanabe H, Marsh PD, Ivanyi L. Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identified by immunoblotting with sera from patients with localized human juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis. *Arch Oral Biol.* 1989;34:649-56.

Weiner JH, Li L. Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778:1698-713.

Wimley WC. The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13:404-11.

Yoshimura F, Murakami Y, Nishikawa K, Hasegawa Y, Kawaminami S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2009;44:1-12.

Yusuf E, Wybo I, Piérard D. Case series of patients with *Fusobacterium nucleatum* bacteremia with emphasis on the presence of cancer. *Anaerobe.* 2016;39:1-3.

Zijlstra EE, Swart GR, Godfroy FJ, Degener JE. Pericarditis, pneumonia and brain abscess due to a combined *Actinomyces-Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Infect.* 1992;25:83-7.

Zilm PS, Bagley CJ, Rogers AH, Milne IR, Gully NJ. The proteomic profile of *Fusobacterium nucleatum* is regulated by growth pH. Microbiology. 2007;153(Pt 1):148-59.

Zohaib Khurshid, Maria Mali, Mustafa Naseem, Shariq Najeeb and Muhammad Sohail Zafar 5,6. Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. Dent. J. 2017; 5-12.



## **ANEXOS**

**Tabla 1.** Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

	Suero	Condición	Sondaje			Placa	Sangrado
			1-3 mm	4-6 mm	>7 mm		
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	C.2	Sano	96,42%	3,57%	0%	10,71%	13,09%
	C.12	Sano	98,76%	1,23%	0%	11,72%	11,72%
	C.26	Sano	100%	0%	0%	20,23%	4,16%
	S.3	Periodontitis	70,24%	20,75%	0%	59,52%	22,83%
	S.4	Periodontitis	45,33%	52%	2,66%	90,66%	40%
	S.9	Periodontitis	39,58%	56,94%	3,47%	97,91%	88,19%
	S.11	Periodontitis	44,66%	43,33%	12%	82%	86%
	S.21	Periodontitis	25,39%	45,23%	29,36%	82,53%	100%
	S.30	Periodontitis	100%	0%	0%	42,59%	11,72%
<i>F. nucleatum</i>	C.2	Sano	96,42%	3,57%	0%	10,71%	13,09%
	C.28	Sano	100%	0%	0%	21,42%	1,78%
	S.1	Periodontitis	69,44%	25%	5,55%	0,66%	19,44%
	S.3	Periodontitis	70,24%	20,75%	0%	59,52%	22,83%
	S.28	Periodontitis	35,80%	62,34%	1,85%	73,91%	57,57%
<i>P. gingivalis</i>	C.2	Sano	96,42%	3,57%	0%	10,71%	13,09%
	C.3	Sano	97,61	2,38%	0%	16,07%	13,09%
	S.10	Periodontitis	60,71%	3,75%	1,78%j	87,5%	100%
	S.17	Periodontitis	20,23%	61,30%	18,45%	75,59%	95,23%
	S.18	Periodontitis	30,70%	38,59%	30,70%	82,45%	100%
	S.27	Enfermo	33,33%	55,76%	10,89%	67,90%	58,33%





**Tabla 2.** Datos microbiológicos obtenidos del fluido gingival crevicular de los pacientes incluidos en el estudio.

<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<i>F. nucleatum</i>		<i>P. gingivalis</i>	
Suero	Concentración bacteriana (ufc/mL)	Suero	Concentración bacteriana (ufc/mL)	Suero	Concentración bacteriana (ufc/mL)
C.2	0	C.2	0	C.2	0
C.12	Aa: 2,1 x 10 <sup>4</sup> Pg: 2 x 10 <sup>4</sup> Tf: 5 x 10 <sup>3</sup> Fn: 2 x 10 <sup>4</sup>	C.28	Fn: 2 x 10 <sup>2</sup>	C.3	Pg: 4 x 10 <sup>3</sup> Pi: 2 x 10 <sup>3</sup> Fn: 1 x 10 <sup>3</sup>
C.26	Aa: 2,2 x 10 <sup>3</sup> Pg: 2 x 10 <sup>3</sup> Pi: 4 x 10 <sup>3</sup> Fn: 5 x 10 <sup>3</sup>	S.1	Pi: 2,8 x 10 <sup>5</sup> Tf: 3,5 x 10 <sup>5</sup> Fn: 4 x 10 <sup>4</sup>	S.10	Pg: 7,8 x 10 <sup>6</sup> Pi: 3,3 x 10 <sup>5</sup> Tf: 7,7 x 10 <sup>5</sup> Fn: 1 x 10 <sup>4</sup>
S.3	Aa: 9,6 x 10 <sup>4</sup> Tf: 1,5 x 10 <sup>5</sup> Fn: 7 x 10 <sup>4</sup>	S.3	Aa: 9,6 x 10 <sup>4</sup> Tf: 1,5 x 10 <sup>5</sup> Fn: 7 x 10 <sup>4</sup>	S.17	Pg: 3 x 10 <sup>3</sup> Pi: 8 x 10 <sup>3</sup> Pm: 1 x 10 <sup>6</sup> Fn: 1 x 10 <sup>4</sup>
S.4	Aa: 6,2 x 10 <sup>5</sup> Pg: 3,7 x 10 <sup>6</sup> Pi: 2,9 x 10 <sup>6</sup> Fn: 1,5 x 10 <sup>6</sup> Capno: 1 x 10 <sup>5</sup>	S.28	Pi: 1,4 x 10 <sup>5</sup> Pm: 3 x 10 <sup>5</sup> Fn: 1,1 x 10 <sup>6</sup> Ec: 1,2 x 10 <sup>5</sup>	S.18	Pg: 1,1 x 10 <sup>7</sup> Pi: 7 x 10 <sup>4</sup> Tf: 9 x 10 <sup>5</sup> Pm: 1,6 x 10 <sup>6</sup>
S.9	Aa: 5,1 x 10 <sup>4</sup> Pg: 1 x 10 <sup>3</sup> Pi: 7 x 10 <sup>4</sup> Tf: 4 x 10 <sup>4</sup> Pm: 3 x 10 <sup>4</sup>			S.27	Pg: 2 x 10 <sup>5</sup> Pi: 1 x 10 <sup>5</sup> Fn: 4 x 10 <sup>4</sup>
S.11	Aa: 2,4 x 10 <sup>3</sup> Pg: 3,9 x 10 <sup>6</sup> Pi: 1,4 x 10 <sup>5</sup> Pm: 2,9 x 10 <sup>5</sup>				
S.21	Aa: 2,2 x 10 <sup>5</sup> Pg: 2,6 x 10 <sup>5</sup> Pi: 2,4 x 10 <sup>5</sup> Tf: 4 x 10 <sup>5</sup> Pm: 2,3 x 10 <sup>5</sup> Cr: 1,4 x 10 <sup>5</sup> Fn: 1 x 10 <sup>5</sup>				
S.30	Aa: 4,4 x 10 <sup>3</sup> Pg: 1,6 x 10 <sup>4</sup> Pi: 5 x 10 <sup>3</sup> Fn: 8 x 10 <sup>3</sup>				

Aa: *A. actinomycetemcomitans* , Pg: *P. gingivalis* , Pi: *Prevotella intermedia*, Pm: *Parvimonas micra* , Fn: *F. nucleatum*, Tf: *Tannerella forsythia*, Cr: *Campylobacter rectus* , Ec: *Eikenella corrodens*, Capno: *Capnocytophaga sputigena*. La concentración bacteriana se ha expresado en unidades formadoras de colonias (ufc) por mL (ufc/mL).



**Tabla 3.** OMPs identificadas de *A. actinomycetemcomitans*.

Nº banda	Identificador (GI)	Nombre de la proteína
1	503933512	YaeT (proteína de membrana externa)
2	502578142 491729990	LptD PgaA (proteína de membrana)
3	491689683	TonB
4	491780231	GroEl
5	491725647 491701003	OMPA-like TdeA (proteína de membrana)
6	491755504	OMP39
7	491725647	OMPA-like
8	491725647	OMPA-like
9	491725647	OMPA-like
10	491761969	OMP18/16



**Tabla 4.** OMPs identificadas de *F. nucleatum*.

Nº banda	Identificador (GI)	Nombre de la proteína
1	A5TT74	Posible proteína de membrana externa
2	A5TVB3	Proteína de autotransporte (familia)
3	A5TSH6	Proteína de membrana externa
5	A5TXR8	Proteína sin caracterizar
6	X8I5C8	Proteína de membrana externa de autotransporte
7	A5TRR3	YaeT (OMP85)
8	A5TTM5	DdpA (diguanylate fosfodiesterasa)
9	A5TRQ6	RnfC (parte de un complejo de membrana implicado en transporte de electrones)
10	A5TV43	FomA (Porina) (proteína de membrana externa)
11	X8HXV1	Peptidasa S8/S53 (familia)
12	A5TY62	Proteína de autotransporte (familia)
13	A5TT95	Proteína transportador tipo ABC (familia) ATP
15	A5TWP4	Proteína sin caracterizar
17	A5TS76	OMPA (familia)



**Tabla 5.** OMPs identificadas de *P. gingivalis* ATCC33277.

Nº banda	Identificador (GI)	Nombre de la proteína
1	73807898	Rag A (Receptor de antígeno A) (OMP)
2	188994592	Proteína de función desconocida PGN-0728 (precursor OMP40)
3	188994593	Proteína de función desconocida PGN-0729 (precursor OMP41)
4	188994158	RagB (Receptor de antígeno B) (OMP)
5	188994592	Proteína de función desconocida PGN-0728 (precursor OMP40)
6	73807898	Rag A (Receptor de antígeno A) (OMP)



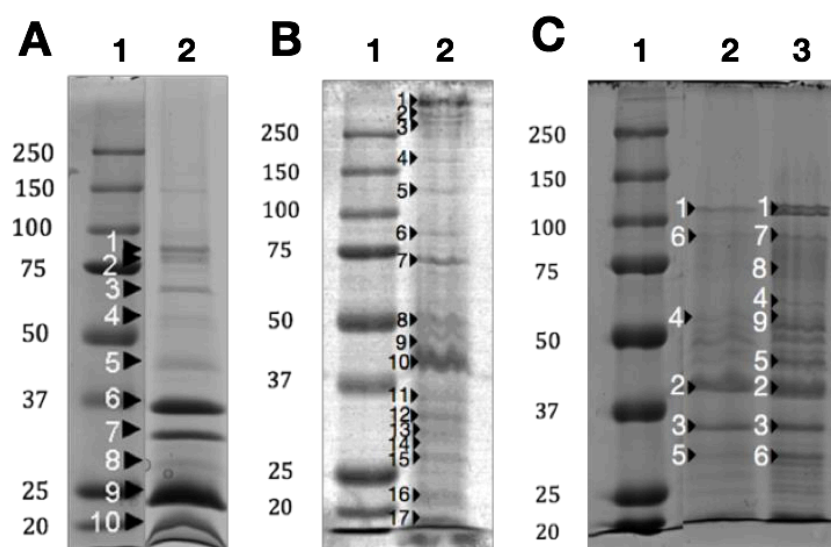


**Tabla 6.** OMPs identificadas de *P. gingivalis* W83.

1	34540042	Rag A (Receptor de antígeno A) (OMP)
2	34540489	Proteína inmunoreactiva antígeno 42 kDa (OMP)
3	34540490	Proteína inmunoreactiva antígeno 43 kDa (OMP)
4	34540043	RagB (Lipoproteína receptor de antígeno)
5	34540322	Arginina cisteín-proteinasa (gingipaína R)
6	34540489	Proteína inmunoreactiva antígeno 42 kDa (OMP)
7	34540042	Rag A (Receptor de antígeno A) (OMP)
8	34541100	Peptidilarginina deiminasa
9	34540043	RagB (Lipoproteína receptor de antígeno)



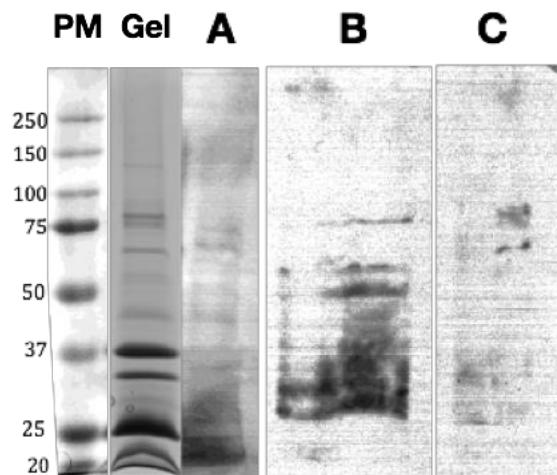
**Figura 1.**



**Figura 1.** Proteínas de membrana externa separadas por SDS-PAGE usando geles de poliacrilamiada al 10% y teñidas con Coomassie: A) *A. actinomycetemcomitans* DSMZ8324: línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, proteínas extraídas de cultivo. B) *F. nucleatum* DSM20482: línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, proteínas extraídas de cultivo. C) *P. gingivalis* ATCC33277 y *P. gingivalis* W83: línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, proteínas extraídas de cultivo de *P. gingivalis* ATCC33277; banda 3, proteínas extraídas de cultivo de *P. gingivalis* W83. Las bandas cortadas del gel e identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) se indicaron con flechas y números.



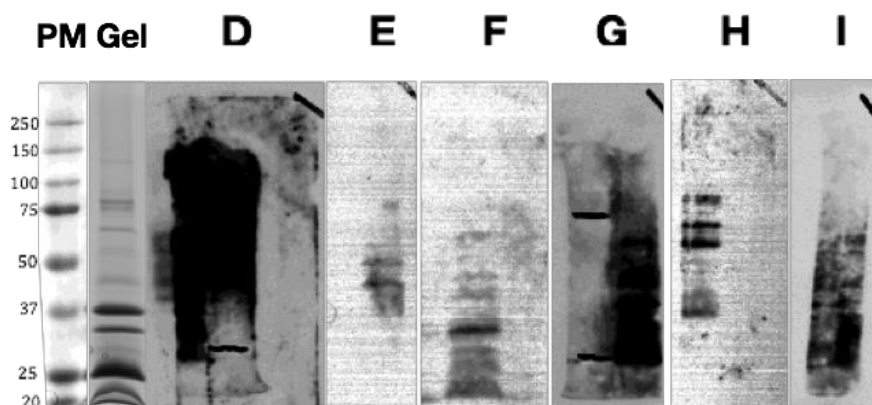
**Figura 2.**



**Figura 2.** Western-blot de los extractos de OMPs de *A. actinomycetemcomitans* usando sueros procedentes de pacientes sanos con presencia de bacterias periodontopatógenas. PM) Marcador de peso molecular. Gel) Gel SDS-PAGE con OMPs de *Aa*. A) Western-blot con suero C2 (suero control) (paciente sano con ausencia de bacterias periodontopatógenas). B) Western-blot con suero C12. C) Western-blot con suero C 26.



**Figura 3.**

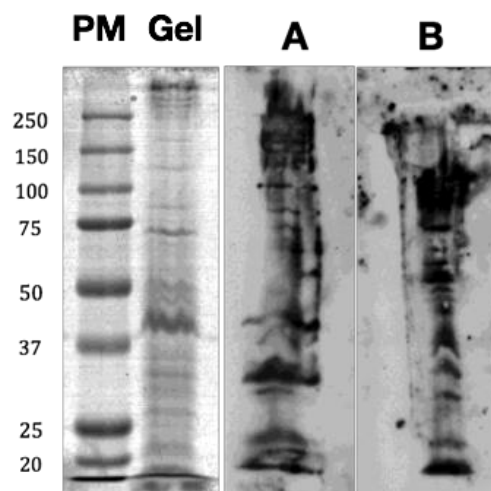


**Figura 3.** Western-blot de los extractos de OMPs de *A. actinomycetemcomitans* usando sueros procedentes de pacientes con periodontitis. PM) Marcador de peso molecular. Gel) Gel SDS-PAGE con OMPs de *Aa*. D) Western-blot con suero S3. E) Western-blot con suero S4. F) Western-blot con suero S9. G) Western-blot con suero S11. H) Western-blot con suero S21. I) Western-blot con suero S30.





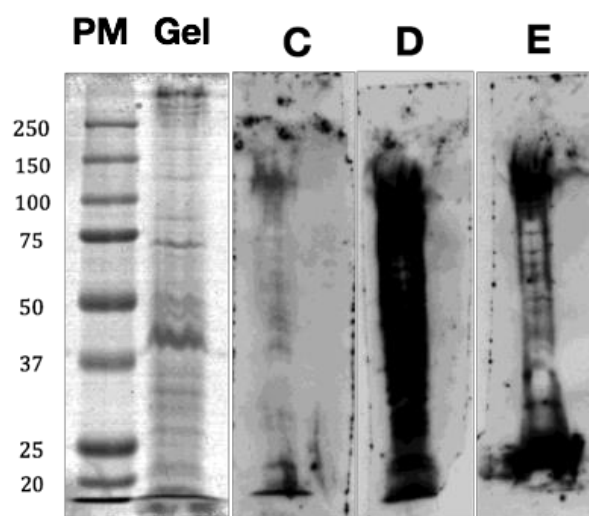
**Figura 4.**



**Figura 4.** Western-blot de los extractos de OMPs de *F. nucleatum* usando sueros procedentes de pacientes sanos con presencia de bacterias periodontopatógenas. PM) Marcador de peso molecular. Gel) Gel SDS-PAGE con OMPs de *Fn*. A) Western-blot con suero C2 (suero control) (paciente sano con ausencia de bacterias periodontopatógenas). B) Western-blot con suero C28.



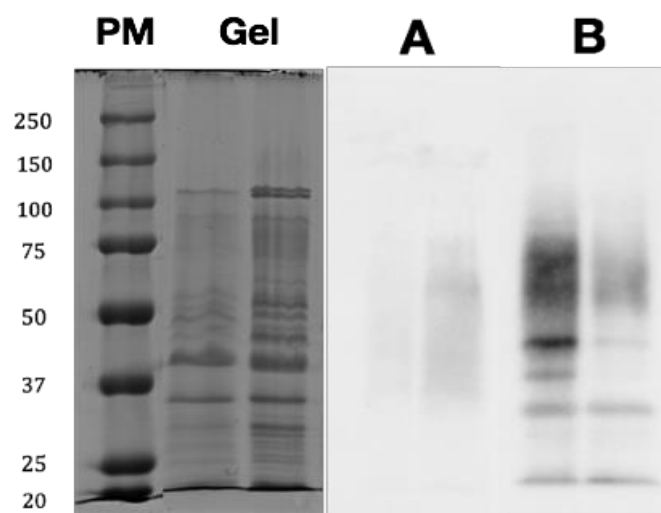
**Figura 5.**



**Figura 5.** Western blot de los extractos de OMPs de *F. nucleatum* usando sueros procedentes de pacientes con periodontitis. PM) Marcador de peso molecular. Gel) Gel SDS-PAGE con OMPs de *Fn*. C) Western-blot con suero S1. E) Western-blot con suero S3. F) Western-blot con suero S28.



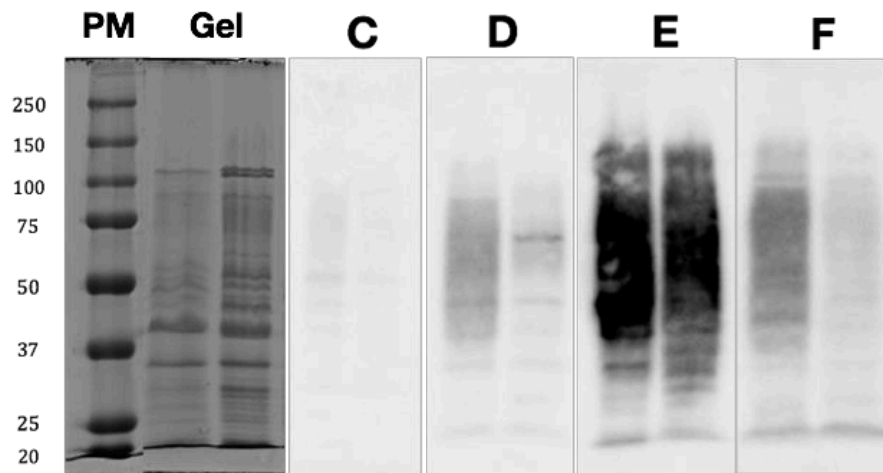
**Figura 6.**



**Figura 6.** Western-blot de los extractos de OMPs de *P. gingivalis* usando sueros procedentes de pacientes sanos con presencia de bacterias periodontopatógenas. PM) Marcador de peso molecular. Gel) Gel SDS-PAGE con OMPs de *Pg* (carril 1 *Pg* ATCC33277, carril 2 *Pg* W83). A) Western-blot con suero C2 (suero control) (paciente sano con ausencia de bacterias periodontopatógenas) (carril 1 *Pg* W83, carril 2 *Pg* ATCC33277). B) Western-blot con suero C3 (carril 1 *Pg* W83, carril 2 *Pg* ATCC33277).



**Figura 7.**



**Figura 7.** Western-blot de los extractos de OMPs de *P. gingivalis* usando sueros procedentes de pacientes con periodontitis. PM) Marcador de peso molecular. Gel) Gel SDS-PAGE con OMPs de *Pg* (carril 1 *Pg* ATCC33277, carril 2 *Pg* W83). C) Western-blot con suero S10 (carril 1 *Pg* W83, carril 2 *Pg* ATCC33277). D) Western-blot con suero S17 (carril 1 *Pg* W83, carril 2 *Pg* ATCC33277). E) Western-blot con suero S18 (carril 1 *Pg* W83, carril 2 *Pg* ATCC33277). F) Western-blot con suero S27 (carril 1 *Pg* W83, carril 2 *Pg* ATCC33277).

